

Молекулярно-генетические нарушения в гене *VHL* и метилирование некоторых генов-супрессоров в спорадических светлоклеточных карциномах почки

Д.С. Михайленко¹, М.В. Григорьева², В.В. Землякова¹, В.В. Шкарупо¹, Е.С. Яковлева³, Д.А. Носов³,
Л.Н. Любченко³, С.А. Тюлядин³, Р.В. Курынин⁴, А.М. Попов⁵, Д.В. Залетаев¹, И.Г. Русаков²

¹Медико-генетический научный центр РАМН; ²ФГУ МНИОИ им. П.А. Герцена Росздрава;

³ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва; ⁴урологическая клиника ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова Росздрава;

⁵Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск

Контакты: Людмила Николаевна Любченко clingen@mail.ru

Рак почки (РП) входит в десять наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований у взрослых и представляет собой актуальную проблему современной онкологии. **Цель исследования** — молекулярно-генетический анализ ряда генов-супрессоров при РП, направленный на поиск и характеристику потенциальных маркеров заболевания. Исследовали 209 образцов РП, из которых 192 — светлоклеточные карциномы. Мутации в гене *VHL* выявляли с помощью анализа одноцепочечного конформационного полиморфизма и секвенирования, метилирование генов-супрессоров — посредством метода метилчувствительной полимеразной цепной реакции. Соматические мутации *VHL* были определены в 35,4% случаев светлоклеточного РП (СРП). Нарушения в гене *VHL* обнаружены у 53,7% пациентов с I стадией заболевания, что свидетельствует в пользу инактивации *VHL* на ранних стадиях СРП. Метилирование *VHL* определено в 12, *RASSF1* — в 56, *FHIT* — в 58,4 и *CDH1* — в 46,4% первичных опухолей, метилирование как минимум одного гена — в 84,1% образцов. Гиперметилирование *RASSF1* ассоциировано с поздними стадиями ($p=0,015$) и наличием метастазов ($p=0,036$), *CDH1* — с прогрессией, инвазией и метастазированием первичной опухоли ($p=0,009$, $0,039$ и $0,002$ соответственно). Полученные результаты указывают на возможность использования анализа нарушений *VHL*, метилирования *RASSF1* и *CDH1* при разработке системы молекулярно-генетических маркеров РП.

Ключевые слова: светлоклеточный рак почки, мутация, молекулярно-генетический анализ, гены-супрессоры, метилирование, секвенирование

Molecular genetic disorders in the *VHL* gene and methylation of some suppressor genes in sporadic clear-cell renal carcinomas

D.S. Mikhailenko¹, M.V. Grigoryeva², V.V. Zemlyakova¹, V.V. Shkarupov¹, E.S. Yakovleva³, D.A. Nosov³,
L.N. Lyubchenko³, S.A. Tyulyandin³, R.V. Kuryinin⁴, A.M. Popov⁵, D.V. Zaletayev¹, I.G. Rusakov²

¹Medical Genetic Research Center, Russian Academy of Medical Sciences; ²P.A. Herzen Moscow Research Oncological Institute, Russian Agency for Health Care; ³N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;

⁴Urology Clinic, I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Russian Academy of Medical Sciences;

⁵Medical Radiology Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Obninsk

Renal carcinoma (RC) is one of ten most common malignancies in adults and an urgent problem of modern oncology. The purpose of the study was to make a molecular genetic analysis of a number of suppressor genes in RC, which was aimed at searching for and characterizing the potential markers of the disease. Two hundred and nine RC samples were examined, of them there were 192 clear-cell carcinomas. *VHL* gene mutations were detected by single-strand conformation polymorphism and sequence analyses while the methylation of suppressor genes was by the methylation-sensitive polymerase chain reaction. Somatic *VHL* mutations were determined in 35.4% of cases of clear-cell RC (CCRC). *VHL* gene disorders were found in 53.7% of patients with Stage I, which counts in favor of *VHL* inactivation in early-stage CCRC. The methylation of the *VHL*, *RASSF1*, *FHIT*, and *CDH1* genes was identified in 12, 56, 58.4, and 46.4% of primary tumors, respectively; that of at least one gene was in 84.1% of the samples. The hypermethylation of the *RASSF1* gene was associated with late stages ($p = 0.015$) and the presence of metastases ($p = 0.036$); that of the *CDH1* gene was related to the progression, invasion, and dissemination of primary tumors ($p = 0.009$, 0.039 , and 0.002 , respectively).

The findings show it possible to use an analysis of abnormalities in the *VHL* gene and the methylation of the *RASSF1* and *CDH1* genes to develop a system of molecular genetic markers of RC.

Key words: clear-cell renal carcinoma, mutation, molecular genetic analysis, suppressor genes, methylation, sequencing

Введение

В России ежегодно диагностируют около 16 тыс. случаев заболеваемости раком почки (РП), а в мире каждый год РП заболевают > 200 тыс. человек, что позволяет считать РП актуальной проблемой современной онкологии [1]. РП — гетерогенная группа злокачественных опухолей, 75–80% из которых приходятся на светлоклеточный РП (СРП), 10–5% составляют папиллярные карциномы, 5% — хромофобная карцинома и оставшиеся 5% представлены редкими формами — карциномой собирательных протоков, онкоцитомой и др. [2]. В течение последних 10 лет благодаря исследованиям в области молекулярной биологии канцерогенеза накоплено большое число данных о механизмах развития РП (в первую очередь СРП), характерных цитогенетических и молекулярных нарушениях. В качестве потенциальных молекулярно-генетических маркеров СРП могут выступать инактивирующие события в гене *VHL* и метилирование генов-супрессоров [3]. Ген *VHL* подвергается инактивации при СРП в 30–60% опухолей вследствие соматических мутаций, потери гетерозиготности и/или метилирования. Белковый продукт этого гена функционирует как компонент мультипротеинового комплекса, в котором осуществляется убиквитинзависимая деградация индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 α (hypoxia-inducible transcription factor- α). При отсутствии белка *VHL* в клетке накапливается HIF-1 α , индуцирующий экспрессию факторов роста эндотелия сосудов (VEGF — vascular endothelial growth factor), тромбоцитарного (PDGF — platelet-derived growth factor), фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) и других стимуляторов клеточной пролиферации. Такой каскад событий рассматривают как основную модель влияния мутаций *VHL* на формирование клона опухолевых клеток [4]. Метилирование является одним из механизмов инактивации генов-супрессоров, это обратимая модификация ДНК, когда цитозиновый остаток в CpG-динуклеотиде метилируется в позиции N₅ пиримидинового кольца. Методы выявления метилирования и набор генов-кандидатов для РП на сегодняшний день остаются спорными вопросами [5]. **Цель настоящего исследования** — анализ мутаций и метилирования ряда генов-супрессоров при РП, направленный на поиск и характеристику потенциальных маркеров заболевания.

Материалы и методы

Клинический материал. В работе исследовано 209 случаев РП (170 образцов замороженных тканей и 39 парафиновых блоков). Из них 192 (91,9%) случая относились к СРП, 7 (3,3%) — к папиллярным, 4 (1,9%) — к хромофобным карциномам, в единичных наблюдениях представлены онкоцитомы, лейомиосаркома, ангиомиолипома, нефробластома, кистозная нефрома и СРП с транслокацией, вовлекающей хромосому 11. Сопутствующие клинические данные были

доступны для 166 образцов, из них 89 соответствовали I стадии заболевания, 19 — II, 35 — III и 23 — IV. На момент постановки диагноза 16,9% (28 из 166) пациентов имели метастазы в регионарные лимфатические узлы и/или отдаленные метастазы. По степени дифференцировки первичной опухоли образцы распределились следующим образом: 40 — G₁, 79 — G₂, 46 — G₃ и 1 — G₄.

Геномную ДНК из замороженных тканей выделяли методом обработки образцов протеиназой К с последующей фенол-хлороформной экстракцией. Архивные образцы предварительно депарафинизировали с помощью ксилола и этанола [6].

Анализ мутаций в кодирующей части гена *VHL* проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), SSCP-анализа (singl-strand conformation polymorphism analysis — анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма) ПЦР-продуктов и секвенирования; последовательности праймеров и условия ПЦР описаны в работе Т. Kuwai и соавт. [7]. ПЦР-продукты секвенировали с помощью набора ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 и генетического анализатора ABI PRISM 3100 («Applied Biosystems»).

Метилирование генов-супрессоров определяли методом метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР), последовательности праймеров для которой опубликованы нами ранее [8]. Предварительно 1 мкг геномной ДНК обрабатывали 20 е.а. метилчувствительной рестриктазы BstHNI («СибЭнзим», Новосибирск) при температуре 50°C в течение 10–12 ч (при анализе метилирования *CDH1* использовали рестриктазу HpaII и температуру 37°C). Для бисульфитного секвенирования геномную ДНК обрабатывали в соответствии со стандартным протоколом бисульфитной конверсии [9]. Дизайн праймеров для метилспецифической ПЦР выполнен с помощью программы MethPrimer, доступной на сайте <http://www.urogene.org/methprimer/>.

Статистический анализ данных. Сравнительный анализ абсолютных частот метилирования проводили с помощью точного двустороннего критерия Фишера. Комплексный анализ встречаемости соматических мутаций и метилирования в нескольких группах осуществляли при использовании критерия χ^2 . При обработке данных применяли программы GraphPadInStat v.3.05 и Statistica v. 6.0.

Результаты и обсуждение

Мутации *VHL* определены в 35,4% (68/192) случаев СРП (табл. 1). Все выявленные мутации были соматическими, т.е. присутствовали только в опухолевой ткани и не обнаруживались в соответствующих им участках нормальной почечной паренхимы, что наряду с клиническими данными по архивным образцам позволило исключить синдром Гиппеля — Линдау и рассматривать имеющиеся образцы как выборку спорадического СРП. Среди обнаруженных мутаций ($n=68$) 46 (67,6%) составляли делеции, 9 (13,2%) — инсерции

Таблица 1. Соматические мутации *VHL*, выявленные в образцах СРП

Экзон		
1 (интрон 1)	2 (интрон 2)	3
c. 151G→T	c. 346_347del	c. 472C→G
c. 155_196del	c. 359_368del	c. 474_477del
c. 162_166del	c. 377_381del (2 случая)	c. 478_481del
c. 165_169del	c. 379delG (2 случая)	c. 506T→C
c. 167_172del	c. 390delT	c. 509T→C
c. 175_181del	c. 392_408del	c. 512_517del
c. 175_177delinsTC	c. 395delA	c. 514_527del
c. 192_200del	c. 395dupA	c. 535_540del
c. 195delG	c. 401delA	c. 572delA
c. 208_209insCG	c. 401dupA	c. 590delA
c. 234T→G (2 случая)	c. 406dupT	c. 597_604del
c. 242_248del	c. 416dupC	c. 626dupA
c. 245_246del	c. 421delA	c. 633_634del
c. 249_257del	c. 430_431del	
c. 256delC	c. 432delA	
c. 262T→G (2 случая)	c. 434delA	
c. 263delG	c. 440_442del	
c. 263G→T	c. 440_443del	
c. 275_276insGG	c. 440_441dup	
c. 277delG	c. 441delinsAA	
c. 293A→T	c. 444_445del (2 случая)	
c. 307delC	c. 450_451insTAT	
c. 311_320del	c. 464–1_469del	
c. 321delC	c. 464–3C→G	
c. 336_340del		
c. 340+2_340+4del		

и дупликации, 11 (16,2%) — однонуклеотидные замены, оставшиеся 2 (3%) приходятся на комплексные мутации. В 40 (58,8%) случаях мутации приводили к сдвигу рамки считывания и формированию новых стоп-кодонов. Четыре делеции в экзоне 1, 1 — в экзоне 2 и 2 — в экзоне 3 не меняли рамку считывания, но сопровождалась потерей сайтов связывания HIF1-α или элонгина C, что критично для выполнения белком своей функции. Делеция c. 340+2_340+4del повреждала донорный сайт сплайсинга в первом интроне, а делеция c. 464–1_469del и миссенс-мутация c. 464–3C→G — акцепторный сайт сплайсинга во втором интроне. Анализ влияния мутаций на структуру транскрипта проводился с помощью интерактивной программы поиска сайтов сплайсинга (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). Делеции c.196delG и c. 336_340del формировали стоп-кодоны вместо аминокислотных остатков. Соматические мутации в виде однонуклеотидных замен представляли собой миссенс мутации p.Asn78Lys (2 случая), p.Trp88Gly (2 случая), p.Trp88Leu, p.Tyr98Phe, p.Leu158Val, p.Leu169Pro, p.Val170Ala и нонсенс-мутацию p.Glu51X. Первые 6 миссенс-мутаций изменяли структуру участка связывания HIF1-α в β-домене, последние 3 затрагивали участок связывания элонгина C в α-домене *VHL*.

Выявленные в настоящем исследовании соматические мутации представлены в основном делециями со сдвигом рамки считывания. За исключением участка, кодирующего N-концевую последовательность *VHL*, мутации распределены равномерно по всей кодирующей части гена с незначительным максимумом в районе локализации последовательности 5'-GCCTATTTTGCC-3' во втором экзоне. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей о том, что для СРП характерны мутации типа loss of function, отсутствие горячих точек мутагенеза и преобладание делеций/инсерций над другими типами мутаций в отличие от СРП при синдроме Гиппеля — Линдау, при котором преобладают миссенс-мутации в определенных частях *VHL* [10]. Аберрантное метилирование промотора *VHL* определено в 12,5% (24 из 192) образцов СРП.

В исследованных папиллярных, хромофобных и более редких типах опухолей почки (*n*=17) инактивирующих событий *VHL* не выявлено, тогда как среди 192 образцов СРП мутации и/или метилирование этого гена определено в 87 (45,3%) образцах. Наблюдаемые различия в частоте инактивирующих событий достоверны (*p*=0,001), что указывает на специфичность молекулярно-генетических повреждений *VHL* при СРП и находится в соответствии с патогенетической моделью развития *VHL*-ассоциированных опухолей, предложенной рядом авторов [11]. Проведен сравнительный анализ встречаемости соматических мутаций и метилирования в различных клинических группах

пациентов (необходимая сопутствующая информация была доступна для 153 из 192 образцов СРП), сформированных в зависимости от стадии заболевания, степени дифференцировки первичной опухоли и наличия метастазов на момент постановки диагноза. Нами не обнаружено ассоциаций молекулярно-генетических нарушений *VHL* с названными выше параметрами. Следует отметить, что хотя бы одно из нарушений (мутация и/или метилирование) было определено у 53,7% (44 из 82) пациентов с I стадией СРП, что свидетельствует в пользу инактивации этого гена на ранних этапах развития первичной опухоли. Некоторые авторы придерживаются мнения о том, что инактивация *VHL* имеет важное значение в начале формирования опухолевого клона, но не определяет особенностей прогрессии первичной опухоли [12].

Тем не менее молекулярно-генетические нарушения *VHL* могут учитываться при оптимизации таргетной терапии. Основным методом лечения СРП остается хирургическое удаление опухоли, при метастатическом СРП назначают иммунотерапию, которая эффективна лишь у 20–25% пациентов, опухоли почки рефрактерны к химио- и лучевой терапии [13]. В последние годы при лечении метастатического СРП все шире используются таргетные препараты (Торисел, Сутент, Нексавар и др.), которые избирательно действуют на ключевые сигнальные молекулы и рецепторы, вовлеченные в канцерогенез СРП [14, 15]. Ключевые мишени этих препаратов (VEGF и его рецепторы – VEGFR 1-го и 2-го типов, рецепторы PDGF – PDGFR) гиперэкспрессируются в ответ на инактивацию гена *VHL*. Следовательно, светлоклеточные карциномы, несущие молекулярно-генетические нарушения *VHL*, могут представлять собой наиболее оптимальные случаи для таргетной терапии.

Кроме *VHL*, было исследовано метилирование генов *RASSF1*, *FHIT* и *CDH1* в 166 первичных опухолях с доступными необходимыми клиническими данными, из которых 153 – СРП, 7 – папиллярные и 4 – хромофобные карциномы, 1 – лейомиосаркома, а также один случай СРП с транслокацией, вовлекающей хромосому 11. Среди исследованных образцов 128 были представлены как опухолевой тканью, так и нормальной почечной паренхимой. В образцах гистологически не измененной почечной паренхимы aberrantного метилирования генов-супрессоров не выявлено. В опухолях ($n=166$) метилирование *VHL* определено в 20 (12,0%), *RASSF1* – 93 (56%), *FHIT* – 97 (58,4%) и *CDH1* – 77 (46,4%) случаях. Частота aberrantного метилирования генов-супрессоров (кроме *VHL*) варьировала в интервале 46–59%, aberrantное метилирование хотя бы одного из всех исследованных генов наблюдали в 84,1% (138 из 164) образцов. В настоящее время анализ метилирования становится особенно актуальным в связи с поиском маркеров РП, выявляемых

в биологических жидкостях пациента. Известно, что фрагменты ДНК опухолевых клеток попадают в кровоток и aberrantное метилирование, специфичное для опухоли, может быть выявлено с помощью ПЦР в плазме (сыворотке) крови. Также описаны успешные примеры обнаружения aberrantного метилирования генов-супрессоров в моче пациентов. Однако применяемые методологические подходы нуждаются в повышении аналитической чувствительности, а панели тестируемых генов – в пополнении новыми генами-кандидатами [16]. Гены *RASSF1*, *FHIT* и *CDH1*, aberrantное метилирование которых определено в большинстве sporadic почечно-клеточных карцином, могут быть компонентами подобной панели маркеров.

Проведен сравнительный анализ частот метилирования в клинических группах, сформированных также, как и при оценке нарушений *VHL* (табл. 2). Вследствие малого (<10) числа образцов в некоторых группах выборка разделена на парные группы: ранние (I и II) и поздние (III и IV) стадии РП, высокие (G_1 и G_2) и низкие (G_3 и G_4) степени дифференцировки. Определена ассоциация гиперметилирования *RASSF1* с поздними стадиями РП ($p=0,015$, относительный риск – ОР 2,31 при 95% доверительном интервале – ДИ 1,18–4,52) и метастазированием ($p=0,036$, ОР 2,75 при 95% ДИ 1,1–6,9). Ген *RASSF1* – один из ключевых генов-супрессоров, который задействован в регуляции клеточной пролиферации и апоптоза, его гиперметилирование наблюдают во многих типах злокачественных новообразований [17]. Опубликованы данные об ассоциации снижения экспрессии *RASSF1* с прогрессией опухоли и меньшей выживаемостью пациентов при РП [18]. Не исключено, что в большинстве случаев инактивация этого гена осуществляется с помощью гиперметилирования. Также выявлена ассоциация aberrantного метилирования *CDH1* с поздними стадиями заболевания ($p=0,009$, ОР 2,39; 95% ДИ 1,24–4,6), низкими степенями дифференцировки первичной опухоли ($p=0,039$, ОР 2,11; 95% ДИ 1,06–4,19) и наличием метастазов на момент постановки диагноза ($p=0,002$, ОР 4,39; 95% ДИ 1,75–11,03). Продукт гена *CDH1*, Е-кадгерин, участвует в обеспечении контактного торможения пролиферации в эпителиальных тканях, в том числе в эпителии почечных канальцев. Инактивацию гена *CDH1* вследствие метилирования можно рассматривать как событие, способствующее инвазивному росту и метастазированию первичной опухоли, и наличие aberrantного метилирования – в качестве критерия неблагоприятного прогноза РП, на что указывают результаты настоящей работы и некоторых других исследователей [19].

Заключение

Изучены мутации и метилирование гена *VHL* при sporadic СРП, определены ассоциации aberr-

Таблица 2. Сравнительный анализ метилирования исследованных генов-супрессоров в различных клинических группах

Показатель	Ген-супрессор			
	<i>VHL</i>	<i>RASSF1</i>	<i>FBIT</i>	<i>CDH1</i>
Стадия заболевания:				
I (n=89)	14 (15,7)	47 (52,8)	52 (58,4)	36 (40,4)
II (n=19)	1 (5,3)	6 (31,6)	13 (68,4)	6 (31,6)
III (n=35)	3 (8,6)	23 (65,7)	16 (45,7)	17 (48,6)
IV (n=23)	2 (8,7)	17 (73,9)	16 (70)	18 (78,3)
Степень дифференцировки первичной опухоли:				
G ₁ (n=40)	3 (7,5)	17 (42,5)	22 (55)	15 (37,5)
G ₂ (n=79)	12 (15,2)	46 (58,2)	46 (58,2)	34 (43)
G ₃ (n=46)	5 (10,9)	29 (63)	29 (63)	27 (58,7)
G ₄ (n=1)	0	1	0	1
Метастазы в регионарные лимфатический узлы и/или отдаленные метастазы:				
нет (n=138)	17 (12,3)	72 (52,2)	79 (57,2)	56 (40,6)
есть (n=28)	3 (10,7)	21 (75)	18 (64,3)	21 (75)

рантного метилирования генов-супрессоров *RASSF1* и *CDH1* с прогрессией и метастазированием первичной опухоли при РП. Полученные результаты вместе с изучением иммуногистохимических и биохими-

ческих особенностей почечно-клеточных карцином в перспективе позволят сформировать систему диагностических и прогностических маркеров РП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России и стран СНГ в 2006 г. Вестн РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2008;19(2 прил 1):6–9.
2. Cheng L., Zhang S., MacLennan G.T. et al. Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification, differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms. Hum Pathol 2009;40:10–29.
3. Михайленко Д.С., Немцова М.В. Молекулярно-генетические маркеры рака почки. Рос онкол журн 2007;(4):48–51.
4. Михайленко Д.С., Курынин Р.В., Попов А.М. и др. Инактивация гена *VHL* при спорадическом светлоклеточном раке почки. Мол Биол 2008;42(1):71–7.
5. Dalgin G.S., Drever M., Williams T. et al. Identification of novel epigenetic markers for clear cell renal cell carcinoma. J Urol 2008;180:1126–30.
6. Херрингтон С., Макги Д. Молекулярная клиническая диагностика. Пер. с английского. М.: Мир, 1999.
7. Kuwai T., Kitadai Y., Tanaka S. et al. Mutation of the von Hippel – Lindau (*VHL*) gene in human colorectal carcinoma: association with cytoplasmic accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha. Cancer Sci 2004;95:149–53.
8. Михайленко Д.С., Попов А.М., Курынин Р.В. и др. Поиск и характеристика молекулярно-генетических маркеров спорадического рака почки. Вестн НИИ молекулярной медицины 2008;(8):52–73.
9. Esteller M. DNA methylation: approaches, methods and applications. Atlanta: CRC Press LLC, 2005.
10. Smits K.M., Schouten L.J., Dijk B.A. et al. Genetic and epigenetic alterations in the von Hippel – Lindau gene: the influence on renal cancer prognosis. Clin Cancer Res 2008;14:782–7.
11. Sudarshan S., Linehan W.M. Genetic basis of cancer of the kidney. Semin Oncol 2006;33:544–51.
12. Nickerson M.L., Jaeger E., Shi Y. et al. Improved identification of von Hippel–Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. Clin Cancer Res 2008;14:4726–34.
13. Wood C.G. Multimodal approaches in the management of locally advanced and metastatic renal cell carcinoma: Combining surgery and systemic therapies to improve patient outcome. Clin Cancer Res 2007;13(2):697–702.
14. Алексеев Б.Я., Шерай П.В. Таргетная терапия распространенного рака почки. Онкоурология 2007;(4):6–11.
15. Choueiri T.K., Vaziri S.A., Jaeger E. et al. Von Hippel–Lindau gene status and response to vascular endothelial growth factor targeted therapy for metastatic clear cell renal cell carcinoma. J Urol 2008;180:860–6.
16. Hoque M.O., Begum S., Topaloglu O. et al. Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cancer. Cancer Res 2004;64:5511–7.
17. Hesson L.B., Cooper W.N., Latif F. The role of *RASSF1A* methylation in cancer. Dis Mark 2007;23:73–87.
18. Tezval H., Merseburger A.S., Matuschek I. et al. *RASSF1A* protein expression and correlation with clinicopathological parameters in renal cell carcinoma. BMC Urol 2008;8:12.
19. Costa V.L., Henrique R., Ribeiro F.R. et al. Quantitative promoter methylation analysis of multiple cancer-related genes in renal cell tumors. BMC Cancer 2007;7:133.